

FILOGENIA MOLECULAR DA GLICOPROTEÍNA (G) E FILODINÂMICA DO VÍRUS DA RAIVA

Maiara Caroline Lúcio Veranos*

Mariana Lázaro Sales†

RESUMO

A raiva é uma zoonose de infecção aguda, sem tratamento que acomete os mamíferos. Seus relatos são datados há décadas e desde então vem se tornando um grande problema de saúde pública, para diversos países do mundo inclusive no Brasil. O vírus da raiva (RABV) é composto por uma fita simples de RNA, o genoma tem aproximadamente 12kb, e é constituído por cinco proteínas (N, P, L, M e G). O estudo da filogenia e epidemiologia foi proposto para identificar e estabelecer relações entre os isolados do RABV no mundo. O objetivo foi realizar análises das sequências de nucleotídeos do RABV a fim de estabelecer uma relação filogenética entre as estirpes brasileiras com isolados de outros países. Foram selecionadas 57 sequências nucleotídicas do banco de dado *Genbank* e alinhadas utilizando o *ClustalW*, as árvores foram reconstruídas usando o método de *Neighbor-Joining*, com *bootstrap* de 100 repetições. As análises filogenéticas foram desenhadas através do MEGA 6.06. Os resultados evidenciaram que a glicoproteína apresenta a maior variabilidade genética, sendo a distribuição geográfica e os hospedeiros fatores importantes para construção da relação filogenética entre as amostras. Através desse estudo foi possível verificar a similaridade e a variabilidade genética da glicoproteína (G) de amostras isoladas no Brasil e no mundo, observando também que o hospedeiro e a distribuição genética são relevantes na manutenção da doença.

Palavras chave: Filogenia molecular. Zoonoses negligenciadas. Raiva.

ABSTRACT

Rabies is a zoonosis of acute infection, without treatment that affects mammals. Its reports are dated for decades and since then it has become a major public health problem, for many countries in the world, including in Brazil. The rabies virus (RABV) consists of a single strand of RNA, the genome has approximately 12kb, is composed of five proteins (P, N, L, M and G). The study of phylogeny and epidemiology was proposed to identify and establish relation among the worldwide isolated RABV. The aim was to carry out nucleotide sequence analyzes of RABV in order to establish a phylogenetic relation between the Brazilian strains with isolates from other countries. We selected 57 nucleotide sequences from the Genbank and aligned using ClustalW, and the trees were reconstructed using the Neighbor-Joining method, with 100 replicate bootstraps. The phylogenetic analyzes were designed using MEGA 6.06. The results evidenced that the glycoprotein presents greatest genetic variability, being the geographical distributions and the hosts important for the phylogenetic relation among the samples between samples. Through this study was unable to verify the similarity and the genetic variability of the glycoprotein (G) of samples isolated in Brazil and in the world, noting also that the host and the distribution genetics are important in maintaining the disease.

Keywords: Molecular phylogeny. Neglected zoonosis. Rabies.

* Bacharelado em Biotecnologia pela Faculdade Ciências da Vida

E-mail: maiaracaroline166@yahoo.com.br

† Professora orientadora, bacharel em Ciências Biológicas, mestre em Ciências Animais, doutoranda em Ciências Animais pela Universidade Federal de Minas Gerais.

E-mail: mariana.lazarosales@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa altamente letal, que vem percorrendo décadas, tornando-se um grande problema de saúde pública, não somente no Brasil, mas também em vários países (MOUTINHO *et al.*, 2015; OIE, 2016). A contaminação pelo vírus da raiva (RABV) tem ocorrência em mamíferos, inclusive em humanos, que contraíram o vírus através de mordidas e arranhões de animais infectados. (ABREU; CRISZÓSTOMO, 2014). O RABV causa uma infecção que compromete o sistema nervoso central (SNC), causando nas vítimas quadros de agressividade, paresia e óbito em estágios mais avançados da doença. (BABBONIA; MODOLO, 2011; KANITZ *et al.*, 2014).

O RABV esta presente em vários países, principalmente em países pertencentes aos continentes Asiático e Africano. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), morrem em torno de 55.000 pessoas por ano vítimas da raiva no mundo. Dessas mortes, 95% acontecem na África e na Ásia, e 80% são atribuídas às pessoas economicamente desfavoráveis, que vivem em áreas rurais e a maioria são crianças. (ZHU; GUO, 2016; RIDDER *et al.*, 2016).

No Brasil, municípios da região nordeste e municípios próximos à fronteira com a Bolívia apresentam uma maior vulnerabilidade a ter surtos da doença, entretanto, outras regiões também sofrem esporadicamente com essas epidemias. Para que haja a diminuição e até mesmo eliminação dos surtos nessas regiões específicas e em todo país, são necessários programas de intensificação dos métodos de controle, prevenção, tratamento e preparação de pessoas qualificadas para diagnosticar rapidamente os casos suspeitos. (PORTAL DA SAÚDE, 2016).

O governo brasileiro investe por ano cerca de 60 milhões de dólares com medidas profiláticas contra a raiva no Brasil. Por ano, são atendidas em torno de 400 mil pessoas que sofreram algum tipo de acidente com animais, dessas, aproximadamente 270 mil tiveram que ser imunizados com pelo menos uma dose da vacina (MARTINS *et al.*, 2015). Áreas de difíceis acessos, monitoramentos da circulação do RABV, regiões próximos às fronteiras e a vacinação de todos os animais, principalmente daqueles que não possui donos são apontados pelo Programa Nacional de Controle da Raiva no Brasil como uns dos principais desafios encontrados para a erradicação do RABV no país. (CALDAS, 2013).

O genoma do RABV é composto por uma fita simples de RNA e por cinco proteínas: Nucleoproteína, Fosfoproteína, Polimerase, Matriz proteica e Glicoproteína. O estudo da glicoproteína (G) é de bastante relevância, visto sua importância para o vírus. A glicoproteína (G) está presente no envelope e têm funções de ligação com o receptor acetilcolina nicotínico (nAChR), mediando e modulando a comunicação interneural do Sistema Nervoso Central (SNC) e do Sistema Nervoso Periférico (SNP). Estudos tem relatado a ligação dessa proteína com o receptor p75NTR como uma forma do vírus percorrer o SNP até o SNC via endossomal, utilizando um percurso mais rápido. (MARTINS, 2011; BARROS, 2013; GLUSKA *et al.*, 2015).

O estudo de filogenia e epidemiologia molecular procura identificar e estabelecer as relações entre as diferentes formas de vidas e assim estabelecer relações de epidemias dos vírus e sua distribuição geográfica. Trabalhos mostraram que a distribuição do RABV esta relacionada com características da paisagem, topografia, hidrografia, sistemas de produção animal e usos da terra (MARTINS, 2011; GARCIA *et al.*, 2014). Desta forma, o trabalho justifica-se pela importância de realizar um estudo da filogenia molecular da glicoproteína do RABV, a partir de bancos de dados estabelecendo uma relação entre as estirpes brasileiras e os isolados encontrados em outras partes no mundo, a fim de assimilar os vínculos evolutivos do RABV.

Este trabalho expõem as seguintes perguntas norteadoras: Qual a similaridade entre as sequências do RNA do vírus da raiva entre as amostras brasileiras e as amostras isoladas em outros países? Qual o padrão na distribuição dos genótipos do vírus pelo Brasil? Com base nestes questionamentos, são propostas as seguintes hipóteses: As diferenças genotípicas entre as amostras brasileiras e as amostras encontradas em outros países estão associadas há diferentes regiões geográficas, e que os *gaps* e *mismatches* presentes no gene geram uma alta variabilidade genética entre os RABV do Brasil e de outros países.

Para o desenvolvimento deste trabalho foi realizada uma pesquisa bibliográfica descritiva com abordagem qualitativa. Para a epidemiologia molecular do vírus foi utilizado o banco de dados como: *Scielo*, *Medline*, *Lilacs*, e *Pubmed*. As sequências nucleótídicas foram selecionadas através do *GenBank* no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para o alinhamento e reconstrução das

árvores foram utilizado o programa *ClustalW* e o método *Neighbor-Joining* com *bootstrap* de 100 repetições.

O atual trabalho teve como objetivo analisar a filogenia molecular da glicoproteína (G) do RABV a partir das sequências de nucleotídeos disponíveis no banco de dados do *GenBank* (NCBI), estabelecendo uma relação entre as estirpes brasileiras e os isolados encontrados em outras partes no mundo, a fim de assimilar os vínculos evolutivos e ancestrais do RABV buscando a presença de *gaps* e *mismatches* e finalizando com a reconstrução de árvores filogenéticas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A raiva surgiu a mais de quatro mil anos atrás. No início a doença era vista através de duas vertentes: pelos hebreus e egípcios, que acreditavam que a doença era de caráter religioso; e pelos chineses e hindus, que consideravam a raiva uma instabilidade dos elementos que alinham o organismo. No decorrer dos anos, a raiva foi relatada por vários filósofos, onde começaram a descrever a sintomatologia e a transmissão. Aristóteles e outros filósofos foram os primeiros a relatarem que a propagação da raiva ocorria através da mordida de cães infectados, entretanto ainda, não era associada à transmissão da raiva dos cães para humanos. (BABBONI; MODOLO, 2011). A raiva manifestada em humanos foi observada na Escola de Alexandria, logo a doença foi declarada como uma das mais terríveis, desde então a raiva começou a ser uma preocupação social e se estende até os dias atuais. (STEELE, 1975).

O primeiro grande surto de raiva ocorreu na França em 1.271, onde aproximadamente 30 pessoas que viviam num vilarejo vieram a óbito após sofrerem mordidas de lobos infectados com o vírus. No ano de 1.500, o vírus da raiva se espalhou pela Espanha e por parte da Europa Central onde também causou inúmeros óbitos. Em 1.752 a 1.762 após um surto da doença em Londres, ocorreu uma grande matança de cães que aparentemente possuíam o vírus, pagando-se por animal morto. Nesta época ocorreu um massacre de cães, prática essa que, se espalhou por alguns lugares da Europa, chegando a matar 900 cães em um único

dia. Em 1779 ficou terminantemente proibido na Inglaterra que as pessoas economicamente desfavoráveis tivessem cães. (BABBONI; MODOLO, 2011).

Após a chegada dos colonizadores na América Latina, surgiram várias mortes, imediatamente suspeitaram que fossem decorrentes da raiva, e então presumiram que o vírus tivesse sido introduzido no continente através de cães infectados, que vieram da Europa durante as expedições. Em 1.908 no Brasil, foi relatado um surto da doença em animais herbívoros, pesquisadores levantaram a hipótese de que o surto tivesse ocorrido através da transmissão aérea, ou seja, através de morcegos hematófagos. No início essa hipótese foi recusada pela comunidade científica, pois naquela época existia uma pandemia de outras doenças que poderia ser confundida com a raiva, no entanto, anos mais tarde foi confirmada a veracidade da transmissão da raiva pelos morcegos hematófagos. (ANDRADE, 2014).

A raiva é considerada uma patogenia de caráter infeccioso agudo e tem como agente etiológico um vírus (RABV), pertence à família *Rhabdoviridae* e ao gênero *Lyssavirus* (KANITZ, 2014). Morfologicamente o nucleocapsídeo dos virions do RABV tem um formato semelhante de um projétil de arma de fogo, onde é coberto por um invólucro lipoprotéico, seu tamanho é em torno de 180 nm de comprimento por 75 nm de diâmetro. (GOMES *et al.*, 2012; ANDRADE, 2014).

O genoma do RABV é constituído por uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA), com polaridade negativa e contém cinco proteínas que se divide no nucleocapsídeo e no envelope viral. O nucleocapsídeo é composto por três proteínas: Nucleoproteína (N), Polimerase (L) e Fosfoproteína (P). A nucleoproteína (N) é a proteína mais conservada, é considerada muito significativa para o vírus, sendo responsável pela encapsidação do genoma; a polimerase (L), que tem como função a transcrição e replicação viral; e a fosfoproteína (P), que tem uma função regulatória na replicação do vírus, agindo como um cofator durante a transcrição e replicação viral. (BARROS, 2013; OLIVEIRA, 2014).

O envelope viral é composto por duas proteínas: Matriz proteica (M) e Glicoproteína (G), sendo que a matriz proteica (M) tem a função de unir o envelope viral e a ribonucleoproteína interna, e a também esta envolvida na montagem e liberação do vírus; e a glicoproteína (G), que é uma proteína de membrana, considerada uma proteína de fusão, ou seja, conduz a entrada do vírus na célula hospedeira. Estimula a formação de anticorpos neutralizantes, age na resposta

imune contra o vírus, na ativação dos linfócitos T auxiliares e citotóxicos e nos receptores de acetilcolina determinando assim a patogenicidade do vírus no hospedeiro. Devido a essas funções a glicoproteína tem sido amplamente estudada principalmente na produção de vacinas recombinantes (FAHL, 2014; BERNARDINO, 2015).

Para a replicação viral, o RABV se liga aos receptores e penetra na célula do hospedeiro por um processo de endocitose (esse processo de adsorção é mediado pela glicoproteína), a molécula viral se une aos endossomos e devido ao seu meio ácido ocorre o desencadeamento na conformação da glicoproteína liberando a ribonucleoproteína no citoplasma. Após a entrada do vírus na célula, começa a transcrição do vírus na direção 3'—5' pela RNA polimerase que codifica um RNA molde e cinco mRNA e posteriormente traduzidas nas proteínas P, N, M, L e G . Na segunda etapa, as fitas positivas são moldadas para a produção de fitas negativas que serão encapsidadas pelas proteínas N, P e L. A proteína M envolve o complexo genômico juntamente com a glicoproteína, as partículas se ligam gerando o envelope viral. A dispersão do vírus para fora da célula ocorre após os brotamentos virais. (MONTEIRO, 2014).

A raiva possui quatro ciclos epidemiológicos: o ciclo urbano que têm como principal hospedeiro o cão, entretanto, também abrange os gatos; o ciclo rural, no qual o morcego é o transmissor do vírus para várias espécies de animais criados domesticamente como bovinos, equinos, suínos e caprinos; o ciclo silvestre que é uma adversidade nos países onde a raiva já está controlada, pois o vírus pode utilizar diversos animais como hospedeiros (raposa, coioote, sagui, cachorro-do-mato, guaxinins, gambás), e o ciclo aéreo que é pertencente aos morcegos de várias espécies, eles são de extrema importância na manutenção e circulação do vírus, devido ser o único mamífero capaz de voar e isso facilita a transmissão do vírus para outros animais e humanos. (MENEZES, 2013).

A infecção pelo RABV, tanto em humanos quanto em animais, ocorre através da penetração do vírus através de mordidas, arranhões, mucosa e ferimentos abertos. O período de incubação do vírus é variável e pode durar de duas até doze semanas. Vários fatores podem interferir no tempo de incubação do vírus como, local da mordida, carga viral e a imunocompetência do paciente. (BATISTA, 2011).

A disseminação do RABV no organismo acontece após sua replicação nas células musculares próximas ao local que ocorreu a lesão, após o vírus chega ao sistema nervoso central e chegam às glândulas salivares através dos nervos periférico ficando assim livre para sua transmissão, isso ocorre após os primeiros sinais clínicos (SILVA *et al.*, 2015).

A doença é dividida em duas formas clínicas: a forma paralítica, que predomina nos herbívoros causando como sintomas um quadro de afagia, paralisia muscular, febre alta, salivação, ataxia, convulsões cardiorrespiratória, entre outras, tendo o morcego hematófago associado à transmissão. A outra forma clínica é a raiva furiosa, que tem como principais sintomas a inquietação, agressividade, fotofobia e salivação, são observados em carnívoros, tendo os cães associados à transmissão. (CAMPOS, 2011; GOMES, *et al.*, 2012).

Atualmente existem algumas regiões que não tem incidência do vírus da raiva como, por exemplo, a Nova Zelândia, Nova Guiné, Havaí, Oceania, Finlândia, Noruega, Suécia e Portugal. Mesmo após a descoberta da vacina antirrábica, a raiva ainda avança principalmente em animais silvestres, onde existe uma dificuldade em erradicar o vírus, tornando assim um desafio. Na América Latina, África, e Ásia os cães ainda são os principais reservatórios. No Brasil especificamente, os morcegos hematófagos são os principais responsáveis pela transmissão do vírus. (DIVE, 2016). Com a criação do Programa Nacional de Combate e Prevenção a Raiva em 1973, houve um declínio considerável de contaminação por raiva em cães devido às campanhas de vacinação gratuitas no país. (PORTAL BRASIL, 2012).

Existem diversos mecanismos de variabilidade genética, sendo esses responsáveis pela biodiversidade do vírus. Esses mecanismos se divergem em mutações, duplicações, reorganização dos genes e replicações virais. Em se tratando de filogenia, as mutações, deleções e inserções dos genes são os mais utilizados para demonstrar as relações entre os genes. As mutações podem ser basicamente a troca de bases nitrogenadas, podendo ser transições quando ocorre a troca entre duas purinas (A e G), ou por duas pirimidinas (C e T), ou através do método de transversão, quando ocorre a troca de uma purina por uma pirimidina ou de uma pirimidina por uma purina. As deleções (*gaps*) e as inserções provocam exclusão ou inclusão de bases nitrogenadas no genoma, respectivamente. (CALDART *et al.*, 2016).

A epidemiologia molecular se define como a ciência que estuda a evolução molecular de determinado patógeno ou gene, além de estudar os efeitos que os indivíduos podem causar numa estabelecida população, relacionando com a composição gênica e sua importância na distribuição do patógeno e controle da patogenia. Uma importante aplicação da epidemiologia molecular é analisar a presença de polimorfismos e a resistência do hospedeiro. Utiliza-se a filogenética em conjunto com a epidemiologia molecular com o intuito de compreender a fundo como ocorreu, o porquê, e de que forma patologia se disseminou. As análises filogenéticas de um modo geral analisam de forma exploratória as sequências de DNA e proteínas, expondo a evolução e epidemiologia tanto dos agentes etiológicos quanto dos seus hospedeiros. (CALDART *et al.*, 2016).

3 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi realizada uma pesquisa bibliográfica descritiva com abordagem qualitativa. Foi abordada a epidemiologia molecular do Vírus da Raiva (RABV) utilizando os seguintes bancos de dados: *Scielo*, *Medline*, *Lilacs*, e *Pubmed*. Foram pesquisados os seguintes termos: glicoproteína do vírus da raiva, genética dos *Rhabdoviridae*, epidemiologia do RABV, zoonose do vírus da raiva, raiva em humanos, filogenia do RABV, entre outros.

Através do banco de dados *GenBank* (NCBI), foram selecionadas 21 sequências do genoma completo do RABV referente ao Brasil, e 36 sequências do genoma completo do RABV referente à outros países (QUADRO 1). Dentro dessas sequências também foram selecionados os cinco genes do RABV: Polimerase (L), Matriz (M), Nucleoproteína (N), Fosfoproteína (P), e Glicoproteína (G). Os critérios de seleção dessas sequências foram: selecionar sequências de países distintos, hospedeiros diferentes, buscando também o vírus presente em humanos.

O alinhamento global das sequências selecionadas foi realizado utilizando o *ClustalW* (THOMPSON *et al.*, 1994). A história evolutiva foi inferida usando o método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), com a soma do comprimento do ramo = 2.24769860. A percentagem de árvores idênticas, em que a taxa associada

agrupada no teste de *bootstrap* (100 repetições) são mostrados ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985).

A árvore foi desenhada à escala, com comprimentos dos ramos nas mesmas unidades, como os das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método *Maximum Composite Likelihood* (TAMURA *et al.*, 2004) e estão em unidades do número de substituições de bases por sitio. Todas as posições contendo *gaps* e ausências de dados foram eliminados. Houve um total de 1574 posições no conjunto de dados final. Análises de evolução foram realizadas no MEGA 6.06 (TAMURA *et al.*, 2013). A análise de entropia foi realizada no software *Bioedit* (HALL, 1999).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através das sequências selecionadas no *GenBank*, verificou-se que o genoma do RABV contém aproximadamente 12kb, codificando cinco proteínas do vírus: Nucleoproteína (N), Polimerase viral (L), Fosfoproteína (P), Matriz proteica (M) e a Glicoproteína (G). Nas análises filogenéticas observa-se que as variabilidades genômica estão relacionadas com os hospedeiros do qual aquela amostra foi isolada (FIGURA 1). A árvore foi construída a partir de isolados de representantes de todos os quatro ciclos epidemiológicos: urbano, rural, aéreo e silvestre. (KOBAYASHI, 2013).

Através da análise filogenética do genoma completo do RABV (FIGURA 1), verificou-se a relevância dos hospedeiros para a evolução do vírus. Houve a divisão das amostras em dois clados: clado A é composto por amostras de diferentes países e inclui as amostras vacinais, já o segundo clado B é composto pelas amostras brasileiras, norte americanas e da Guiana Francesa. As amostras americanas foram em grandes partes isoladas de diferentes espécies de morcegos, esse fato mostra como o hospedeiro é fundamental na manutenção das variantes da raiva. (FAHL, 2014). No entanto, observando o resultado da árvore para o genoma completo, assim como a árvore para o gene P (Figura 6), podemos observar que para a espécie de morcego *Desmodus rotundus* existem genótipos diferentes, apesar de agrupados um único clado. A evidência atual sugere que a ocorrência da raiva

depende de vários fatores, tais como características da paisagem, topografia, hidrografia, sistemas de produção animal e uso da terra. (GRENFELL *et al.*, 2004).

A entropia é usada para conceder informações sobre a propagação aleatória da variação genética, quando os picos estão baixos indica que há uma menor variabilidade nos nucleotídeos daquela região, e com picos altos indica uma maior variabilidade. (BUTHELEZI, 2016). Portanto de acordo com a entropia realizada neste estudo, indicou uma alta variabilidade genética em todas as cinco proteínas, principalmente na glicoproteína (G), como pode ser observada na figura 2.

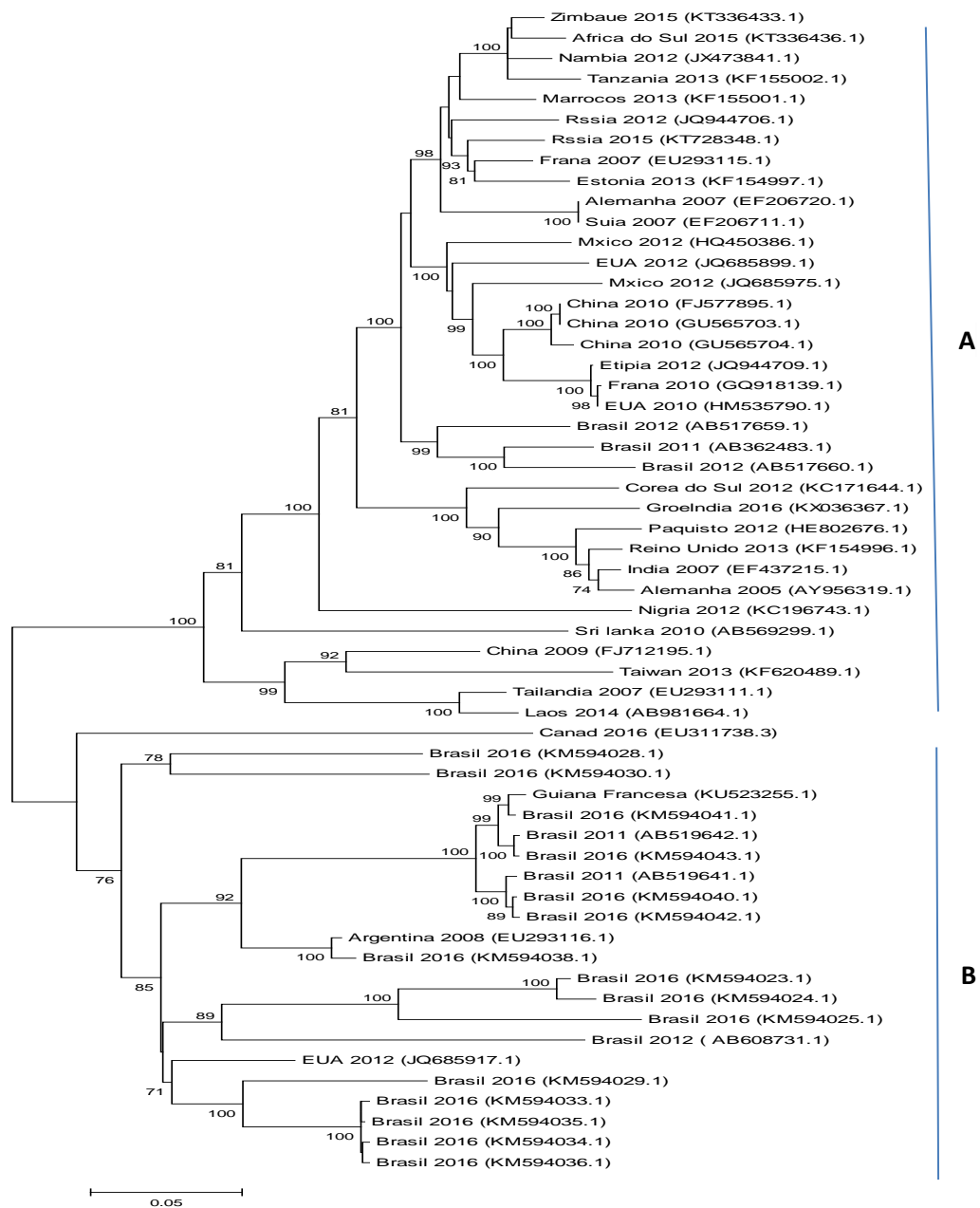


FIGURA 1: Árvore filogenética do genoma completo do vírus da raiva (RABV) das sequências disponíveis no *GenBank* (NCBI), reconstruída utilizando o programa MEGA 6.06. Clado A: composto por amostras pertencentes a outros países. Clado B: composto por amostras brasileiras, americanas e da Guiana Francesa.

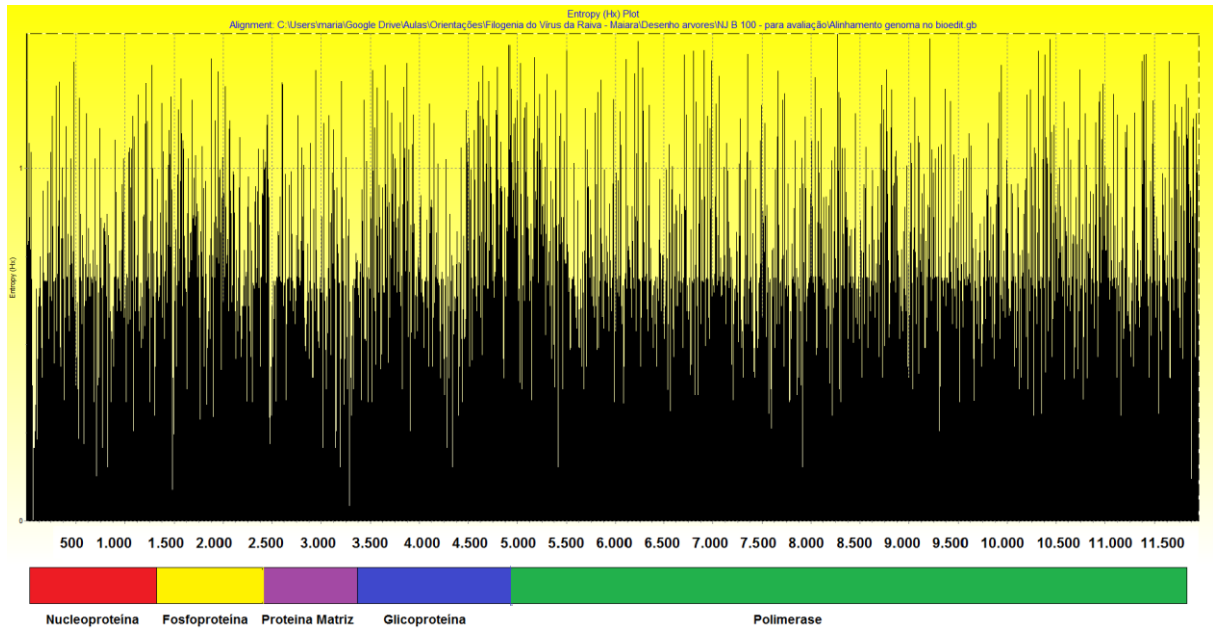


FIGURA 2: Entropia realizada para observar as variações do genoma do RABV. Realizada utilizando o *Bioedit*, onde observou a variabilidade genética das proteínas.

De acordo com Fahl (2015), o genoma do RABV possui uma alta taxa de mutação, e que a nucleoproteína (N) é uma região altamente conservada no genoma, com baixas taxas de mutações em consequência da sua importância e funções exercidas no genoma. Entretanto, de acordo com a análise filogenética e entropia proposto do genoma da nucleoproteína (N) nesse trabalho, a distribuição geográfica do isolado viral influenciaram na variabilidade desse gene gerando a formação de dois clados, deixando evidente que apesar de conservada, a proteína também está sujeita a sofrer variações.

Através da análise filogenética e da entropia do gene G (FIGURA 3), pode-se observar uma alta variabilidade genética. A árvore gerou dois clados: o primeiro clado é composto por países que estão localizados principalmente nos continentes Europeu, Africano e Asiático. Essa distribuição geográfica mostrou que a existência da raiva nesses países pode ser por consequência das proximidades entre eles e o intenso fluxo de pessoas ao longo dos séculos (MEHTA, 2016). As amostras do Brasil (AB517659.1, AB362483.1, AB517660.1), México (HQ450386.1, JQ685975.1) e EUA (JQ685899.1, HM53570.1), foram relacionadas com este clado devido ao tipo de animal infectado, visto que esses animais são pertencentes aos três ciclos epidemiológicos, urbano, rural e selvagem. O segundo clado ficou concentrada a maioria das sequências isoladas nas Américas. No Brasil, foram isolados um grande número de RABV em morcegos. Desde o ano de 2004 estes animais são os

principais transmissores da doença no país, o que pode indicar uma maior dispersão do vírus nesse continente (TORRES *et al.*, 2014, BRASIL, 2015).

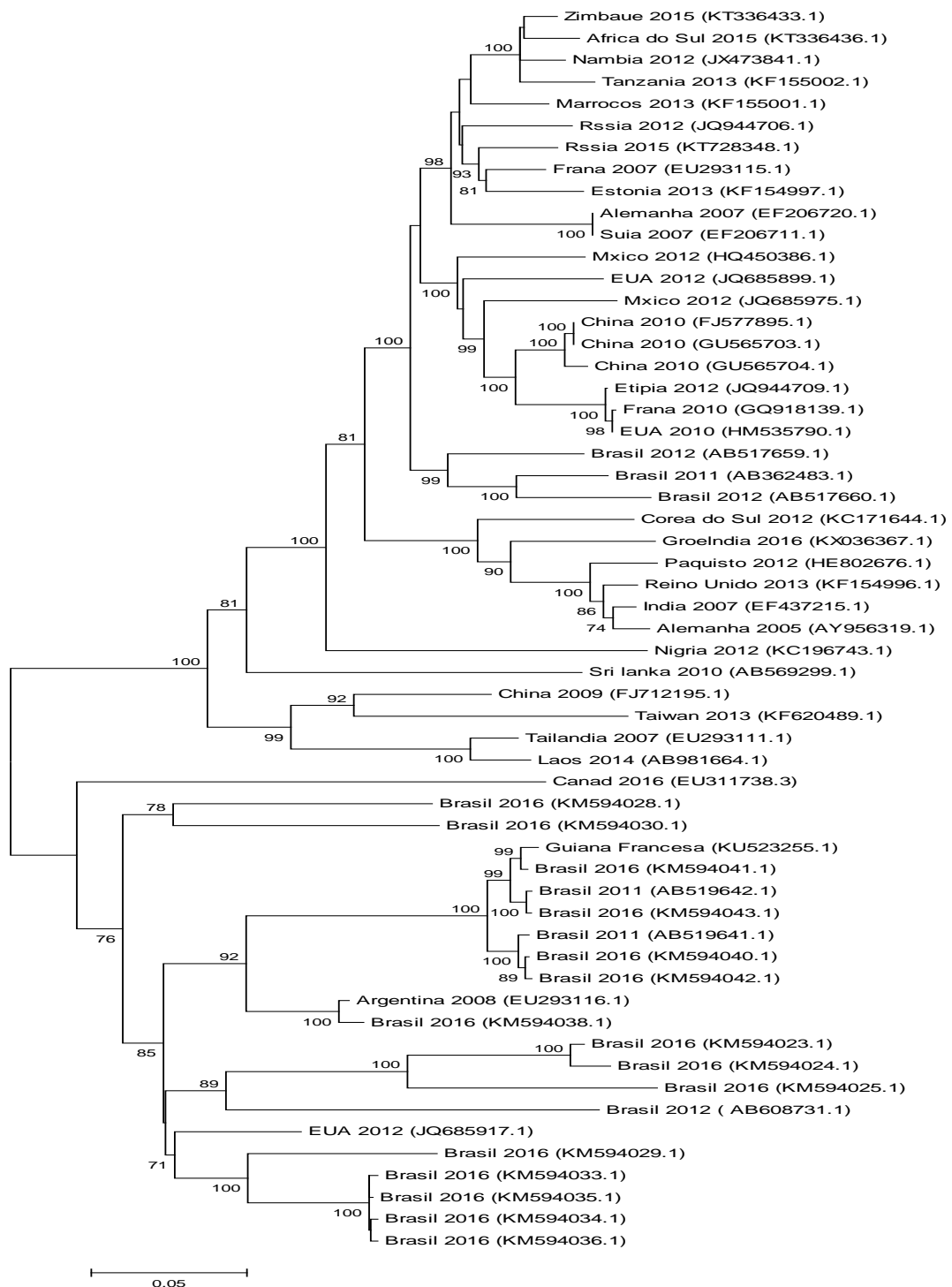


FIGURA 3: Árvore filogenética baseada no gene da Glicoproteína (G) do vírus da raiva (RABV) das sequências disponíveis no *GenBank* (NCBI), reconstruída utilizando o programa MEGA 6.06. Clado A: composto principalmente por amostras dos continentes Asiático, Africano e Europeu. Clado B: composto por amostras das Américas.

A variabilidade da glicoproteína (G) pode ser justificada devido as suas funções exercidas. Por ser uma proteína de fusão, a glicoproteína (G) auxilia a entrada do vírus nas células em especial nas células nervosas, têm a capacidade juntamente com as proteínas N e P, células T auxiliares e citotóxicas de estimular uma resposta imune, além de ser responsável pela produção de anticorpos neutralizantes por conter um domínio antigênico. (RODRIGUES *et al.*, 2007).

As vacinas clássicas antirrábicas são produzidas utilizando o vírus inativado, com características antigênicas do vírus selvagem, e por consequência do alto custo para sua produção, pesquisas sobre vacinas mais eficientes e com preços mais acessíveis estão em evidência, principalmente porque países que têm um alto índice da doença necessitam de vacinas mais baratas visando uma imunização mais efetiva, com doses únicas (KAUR *et al.*, 2015).

Os estudos da glicoproteína (G) para produção de vacinas recombinantes visam uma produção de alta qualidade, baixo custo e sem efeitos colaterais. A molécula da glicoproteína recombinante é instável e hidrofóbica, isso gera dificuldades na obtenção da vacina recombinante. A instabilidade e a hidrofobia da glicoproteína recombinante ocorrem após as modificações traducionais, a sequência deve ser glicosilada permitindo assim que a glicoproteína recombinante chegue à superfície celular, entretanto a glicoproteína recombinante não tem a função de brotamento, e não forma vesículas, e por isso a molécula permanece na membrana plasmática até a sua lise. Sabe-se que o *Rhabdovirus* é capaz de infectar diversos organismos como plantas, mamíferos e insetos, portanto diversos trabalhos têm sido realizados utilizando estes tipos de organismos para a obtenção de vacinas recombinantes, como o uso da *Drosophila melanogaster*, que tem suas células é intensamente estudada como hospedeiro da glicoproteína recombinante. (ASTRAY *et al.* 2016).

O processo de replicação do vírus de RNA resulta em maiores substituições de bases nucleotídicas, ou seja, eles possuem maior taxa de mutação, o que garante ao vírus de RNA a facilidade de adequar aos diferentes hospedeiros escapando do seu sistema imunológico. Em geral se comparado, o vírus de RNA são menos específicos, em relação aos hospedeiros do que os vírus de DNA, e podem propagar mais facilmente entre as diferentes espécies. (BRANDÃO, 2015). Pode ser citado como exemplo o vírus da estomatite vesicular (VSV), esse vírus é também pertencente à família *Rhabdoviridae*, infecta várias espécies de hospedeiros

entre eles os mamíferos, possui a nucleoproteína (N) altamente conservada é endêmico e variável. (RODRIGUES *et al.*, 2007).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho analisou a filogenia molecular da glicoproteína de amostras obtidas do *Genbank*, no qual foi possível compreender os vínculos evolutivos e ancestrais do RABV. Os *gaps* e *mismatches* presentes no gene, causaram uma alta variabilidade genética e a presença de mutações ocasionou uma alta variabilidade genética principalmente da glicoproteína (G), onde foram expostos os possíveis pressupostos sobre essa variabilidade. Através dos resultados obtidos nas análises filogenéticas propostas, foi possível verificar a existência de similaridades evolutivas do RABV existente entre as sequências do Brasil e entre outros isolados do mundo, demonstrando que a distribuição geográfica e os hospedeiros também influenciam na manutenção das variantes da raiva.

Foi observada em vários estudos a reconstrução das árvores filogenéticas utilizando um *bootstrap* de 1000 repetições. Entretanto, essa foi a maior limitação desse trabalho, visto que a reconstrução com 1000 repetições demandava um grande tempo para a reconstrução das árvores, o que tornou inviável a utilização desse método. A demora da reconstrução das árvores fez com que as mesmas fossem reconstruídas utilizando um *bootstrap* de 100 repetições.

REFERÊNCIAS

ABELA-RIDDER, Bernadette *et al.* **2016: the beginning of the end of rabies?** *Atmetric*. v. 4, n.16. p.780-1, 2016.

ABREU, Nilza A.C.; CRIZÓSTOMO, Cilene D. **Perfil epidemiológico do cliente no atendimento antirrábico humano em Teresina-PI.** *Revista Interdisciplinar*, v.7, n.2, p.103-111, abr/jun, 2014.

ANDRADE, Bruno F. M.C. **Avaliação da indicação do tratamento Antirrábico humano em relação à situação Epidemiológica da doença.** 2014.f. 58.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal) - Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filholl. Faculdade de Medicina Veterinária Campus de Araçatuba– UNESP. São Paulo.

ASTRAY R. M *et al.* **Rabies vaccine development by expression of recombinant viral glycoprotein.** Arquivos Virologia. São Paulo, p.3128-9, 2016.

BATISTA, Helena B.C.R. **Caracterização antigênica e Molecular de isolados e desenvolvimento de testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o vírus da raiva.** 2011.f.81. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. Porto Alegre

BABBONI, Selene D.; MODOLO José R. **Raiva: Origem, Importância e Aspectos Históricos.** UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde. p. 349-356, 2011.

BARROS, Hugo Vigerelli de. **Estudo do possível efeito de alcalóides obtidos a partir da secreção cutânea de *Rhinella jimi* e *R.icterica* na penetração do vírus da raiva em células de mamífero mediado pelo receptor nicotínico de acetilcolina.** 2013. f.93. Dissertação (Mestrado em Taxinologia). Curso de Pós-graduação em Toxinologia do Instituto Butantan. São Paulo.

BERNARDINO, Thaissa C. **Expressão da glicoproteína rábica utilizando pseudopartículas virais.** 2015.f. 99. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia – Universidade de São Paulo, Instituto Butatan. São Paulo.

BRANDÃO, Raul E. L. **Vírus e Retrovírus. Contributo para a Evolução das Espécies.** 2015. f. 61. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

BRASIL. **Situação Epidemiológica da Raiva.** 2015. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/752-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/raiva/11431-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 18 nov. 2016.

BUTHELEZI S.G. *et al.* **The Lyssavirus glycoprotein: Akeytocross-immunity.** Virology, v.498 p.250–256, 2016.

CALDAS, Eduardo Pacheco de. **VI Seminário do dia Mundial contra a Raiva.** 2013. Disponível em:< <http://www.saude.sp.gov.br/resources/instituto-pasteur/pdf/wrd2013/situacaoepidemiologicadaraivanobrasileduardo.pdf> > Acesso em: 25 mai. 2016.

CAMPOS, A.C.A. **Estudo da variante do vírus da raiva mantida por populações do morcego hematófago *Desmodus rotundus*.** Tese (Doutorado em Biotecnologia - área de concentração Biotecnologia). Curso de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia. Universidade de São Paulo/Instituto Butantã/ IPT. 2011.

CALDART, E.T. *et al.* **Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular.** *Acta Scientiae Veterinariae*. Londrina, v. 44, p.1392, 2016.

DIVE, Diretoria de Vigilância epidemiológica. **Raiva Animal**. Disponível em: < http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Manual_de_Coleta_para_Raiva.pdf > Acesso em: 06 Abr. 2016.

FAHL, Willian O. **Marcadores moleculares para a patogenia de vírus da raiva: relação entre períodos de incubação, carga viral e os genes codificadores das proteínas virais P e L.** 2014. F.84. Tese de Doutorado em Ciência Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo.

FELSENSTEIN J. **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.** *Evolution* v.39, p.783-791,1985.

GARCIA, Andrea I. E. *et al.* **Phylogenetic analysis of rabies virus isolated from herbivores in Minas Gerais and São Paulo border (2000-2009), Brazil** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.34 n.12, p.1196-1202, dez.2014.

GLUSKA S. *et al.* **Receptor-mediated increase in rabies virus axonal transport.** *Neural Regeneration*. v.10, n.6, p.883-4. Jun/2015.

GOMES, A. P.*et al.* **Raiva humana.** *Revista Brasileira Clinica Medica*. São Paulo,v.10, n.4, p.334-40. Jul/Ago. 2012.

GRENFELL, B.T. *et al.* **Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens.** *Science*. p.327-333, 2004.

HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Oxford Journals*, v.41, p.95-98. 1999.

KANITZ, Fábio A. *et al.* **Epidemiologia molecular de surto de raiva bovina na região central do Rio Grande do Sul, 2012.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v.44, n.5, p.834-840, mai., 2014.

KOBAYASHI, Yuki *et al.* **Isolation of a phylogenetically distinct rabies virus from a tufted capuchin monkey (Cebus apella) in Brazil.** Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.09.020> Acesso em: 16 nov 2016.

KAUR M. *et al.* **Rabies vaccines: where do we stand, where are we heading?** *Expert Review Vaccines*. v.14, n .3, p.369–381, 2015.

MARTINS, Greice Kelly Menezes. **Baculovírus como vetor para expressão da glicoproteína do vírus da raiva em células de inseto e de mamífero e análise transcricional de células infectadas com vírus da dengue.** 2011.f.106.Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Ciências e Saúde, Universidade de Brasília. Brasília.

MARTINS Viviane B. *et al.* **Avaliação do Diagnóstico Laboratorial do Programa de Controle da Raiva Urbana no Rio de Janeiro, Brasil entre 2002-2011.** Revista Vigilância Sanitária Debate. Rio de Janeiro, v.3, n.3, p.56-63, 2015.

MEHTA S. *et al.* **Molecular characterization of nucleoprotein rabies virus gene from Maharashtra, India.** Journal of Postgraduate Medicine .v.62, n. 2, p.105-108, Apr/Jun 2016.

MENEZES, **Basílio M. Caracterização Molecular de isolados do Vírus rábico dos estados do RN, PB e P.** 2013.f.65. Dissertação de Mestrado em Ciências Animal. Universidade Federal Rural, Campus Mossoró. Rio Grande do Norte.

MONTEIRO, Daniella C.V. **Purificação e imunogenicidade da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) expressa pelos sistemas células s2 e Semliki Forest Vírus.** 2014. 2014.f. 138.Tese de Doutorado em Biotecnologia. Universidade de São Paulo, Instituto Butantã. São Paulo.

MOUTINHO, Flavio F.B. *et al.* **Raiva em morcego não hematófago em área urbana do Município de Niterói – RJ.** Revista Brasileira de Ciência Veterinária, v. 22, n. 2, p. 99-102, abr/ jun., 2015.

OIE. **World Organization for animal Health.** Disponível em: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/rabies-portal/about-rabies/> Acesso em: 04 mar. 2016.

OLIVEIRA, R.N. **Modos e tempo de evolução em linhagens do vírus da raiva (RABV) mantidos por reservatórios aéreos e terrestres com base em genomas completos.** 2014.f.137. Tese de Doutorado em Ciências Animal- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo.

PORTAL BRASIL. **Brasil é exemplo na erradicação da raiva animal e humana no mundo.** 2012. Disponível em < <http://www.brasil.gov.br/saude/2012/10/brasil-e-exemplo-na-erradicacao-da-raiva-animal-e-humana-no-mundo>> Acesso em: 06 abr. 2016.

PORTAL DA SAÚDE. **Raiva: análise da situação Epidemiológica da Raiva no período de 2011 a 2016.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/27/Informe-epidemiologico-raiva.pdf>> Acesso em: 25 mai. 2016.

RODRIGUES Luís L.*et al.* Rhabdoviridae . 2007.In: FLORES, Eduardo F.**Virologia Veterinária. Santa Maria.** Editora UFSM. 2007. p.691-718.

SAITOU, N.; NEI, M. **The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees.** Molecular Biology and Evolution.v.4, p.406-425. 1987.

SILVA, L. A. *et al.* **Raiva em animais silvestres.** Científica Univiçosa, v.3, n.1,p. 265-270, jan/dez. 2013.

STEELE, J.H. History of rabies. In: Baer GM. **The natural history of rabies**. New York: Academic Press, p.1-29. 1975.

TAMURA K., *et al.* **Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**,v.101, p.11030-11035, 2004.

TAMURA K, *et al.* **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0**. *Molecular Biology and Evolution*. v.30, n.12.p.2725-9.Dec/2013.

THOMPSON, J. D. *et al.* **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice**. *Nucleic Acids Research*.v.22, n.22, p.4673–4680.1994.

TORRES C.*et al.* **Phylodynamics of vampire rabies in bats-broadcast in Argentina** *Molecular Ecology*.v. 23, n. 9, p.2340-2352, 2014.

ZHU, Shimao; GUO, Caiping. **Rabies Control and Treatment: From Prophylaxis to Strategies with Curative Potential**. *Viruses*. China, v. 8, n.11, p.279, 2016.

ANEXOS

QUADRO 1: Sequências recuperadas do *GenBank* utilizadas para reconstrução filogenética.

Número de Acesso	Local de isolamento	Ano	Espécie de isolamento
KM594035.1	Brasil	2012	Morcego (<i>Nyctinomops laticaudatus</i>)
AB362483.1	Brasil	2011	Raposa (<i>Dusicyon sp.</i>)
AB517659.1	Brasil	2012	Cão
AB517660.1	Brasil	2012	Raposa
AB519641.1	Brasil	2011	Morcego (<i>Artibeus lituratus</i>)
AB519642.1	Brasil	2011	Morcego (<i>Desmodus rotundus</i>)
AB608731.1	Brasil	2012	Morcego (<i>Lasiurus ega</i>)
KM594023.1	Brasil	2016	Sagui- de- tufos-brancos
KM594024.1	Brasil	2016	Sagui-de- tufos-brancos
KM594025.1	Brasil	2016	Sagui-de- tufos-brancos
KM594028.1	Brasil	2016	Morcego (<i>Eptesicus furinalis</i>)
KM594029.1	Brasil	2016	Morcego (<i>Eptesicus furinalis</i>)
KM594030.1	Brasil	2016	Morcego (<i>Myotis nigricans</i>)
KM594033.1	Brasil	2016	Morcego (<i>Tadarida brasiliensis</i>)
KM594034.1	Brasil	2016	Morcego (<i>Nyctinomops laticaudatus</i>)
KM594036.1	Brasil	2016	Morcego (<i>Nyctinomops laticaudatus</i>)
KM594038.1	Brasil	2016	Morcego (<i>Tadarida brasiliensis</i>)
KM594040.1	Brasil	2016	Morcego (<i>Desmodus rotundus</i>)
KM594041.1	Brasil	2016	Morcego (<i>Desmodus rotundus</i>)
KM594042.1	Brasil	2016	Morcego (<i>Desmodus rotundus</i>)
KM594043.1	Brasil	2016	Bovino
EU293116.1	Argentina	2008	Morcego (<i>Tadarida brasiliensis</i>)
FJ577895.1	China	2010	Amostra Vacinal
FJ712195.1	China	2009	Furão-texugo chinês
GQ918139.1	França	2010	Estirpe de vacina
GU565703.1	China	2010	Amostra Vacinal
GU565704.1	China	2010	Amostra Vacinal
HM535790.1	Estados Unidos	2010	Rato
HQ450386.1	México	2012	Cão

JQ685899.1	Estados Unidos	2012	Raposa Cinzenta
JQ685917.1	Estados Unidos	2012	Coioote
JQ685975.1	México	2012	Doninha
JQ944706.1	Rússia	2012	Cão
JQ944709.1	Etiópia	2012	Isolado de vacina
KF155001.1	Marrocos	2013	Bovino
KT336433.1	Zimbábue	2015	Cão
KT728348.1	Rússia	2015	Humano
KX036367.1	Groelândia	2016	Raposa do ártico
EU311738.3	Canadá	2016	Guaxinim
KT336436.1	África do Sul	2015	Cão
KU523255.1	Guiana Francesa	2016	Morcego (<i>Desmodus rotundus</i>)
EF206720.1	Alemanha	2007	Amostra vacinal
EF206711.1	Suíça	2007	Amostra vacinal
KC171644.1	Coreia do Sul	2012	Guaxinim
KC196743.1	Nigéria	2012	Cão
JX473841.1	Namíbia	2012	Cudo
EU293115.1	França	2007	Raposa
EU293111.1	Tailândia	2007	Humano
EF437215.1	Índia	2007	Humano
AB569299.1	Sri Lanka	2010	Humano
AB981664.1	Laos	2014	Cão
KF620489.1	Taiwan	2013	Texugo Furão
AY956319.1	Alemanha	2005	*
HE802676.1	Paquistão	2012	Bovino
KF155002.1	Tanzânia	2013	Cão
KF154997.1	Estônia	2012	Guaxinim
KF154996.1	Reino Unido	2013	Humano

Fonte: GenBank (NCBI); *não consta no banco de dados

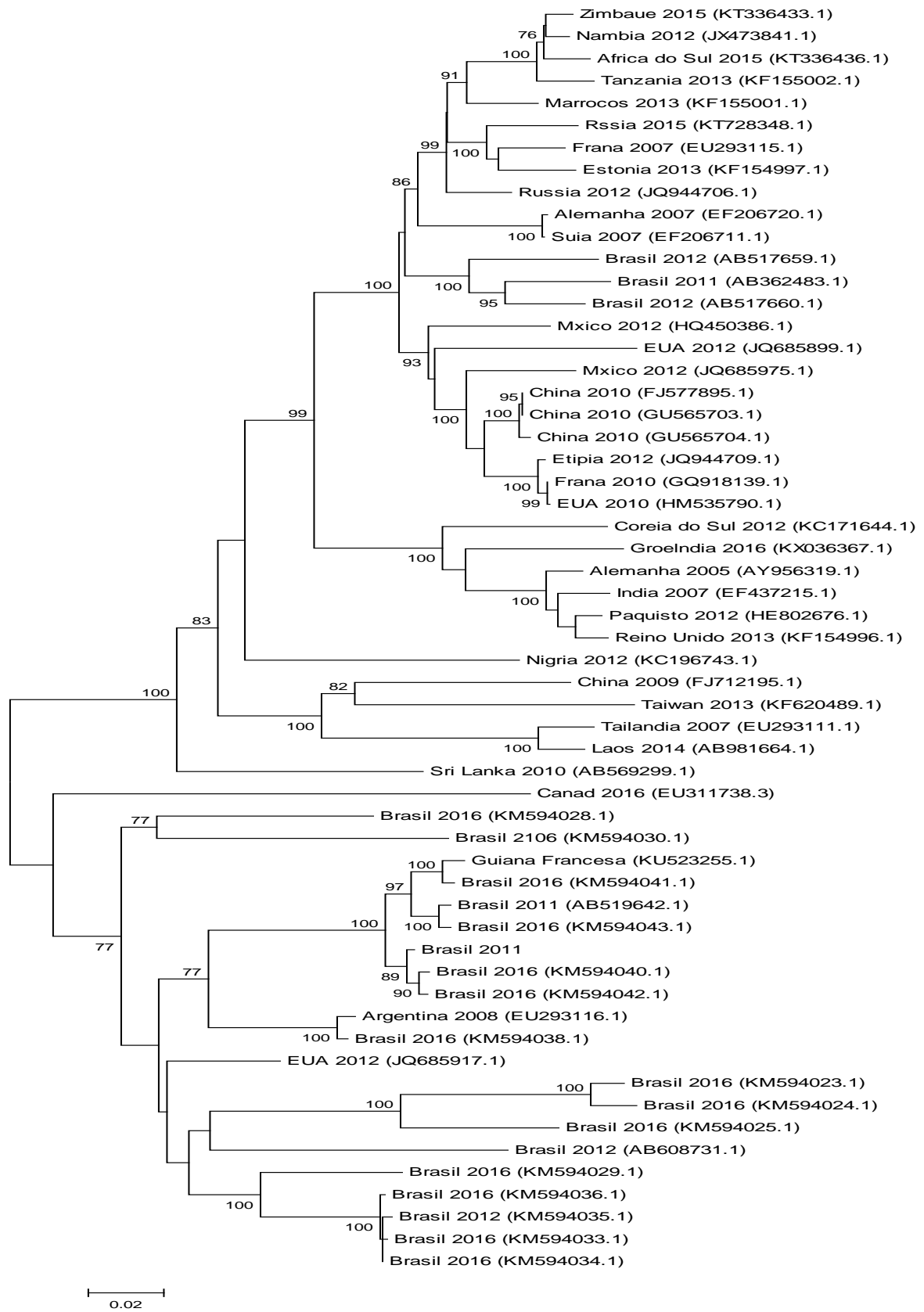


FIGURA 4: Árvore filogenética baseada no gene da nucleoproteína (N) do vírus da raiva (RABV) das seqüências disponíveis no *GenBank* (NCBI), reconstruída utilizando o programa MEGA 6.06.

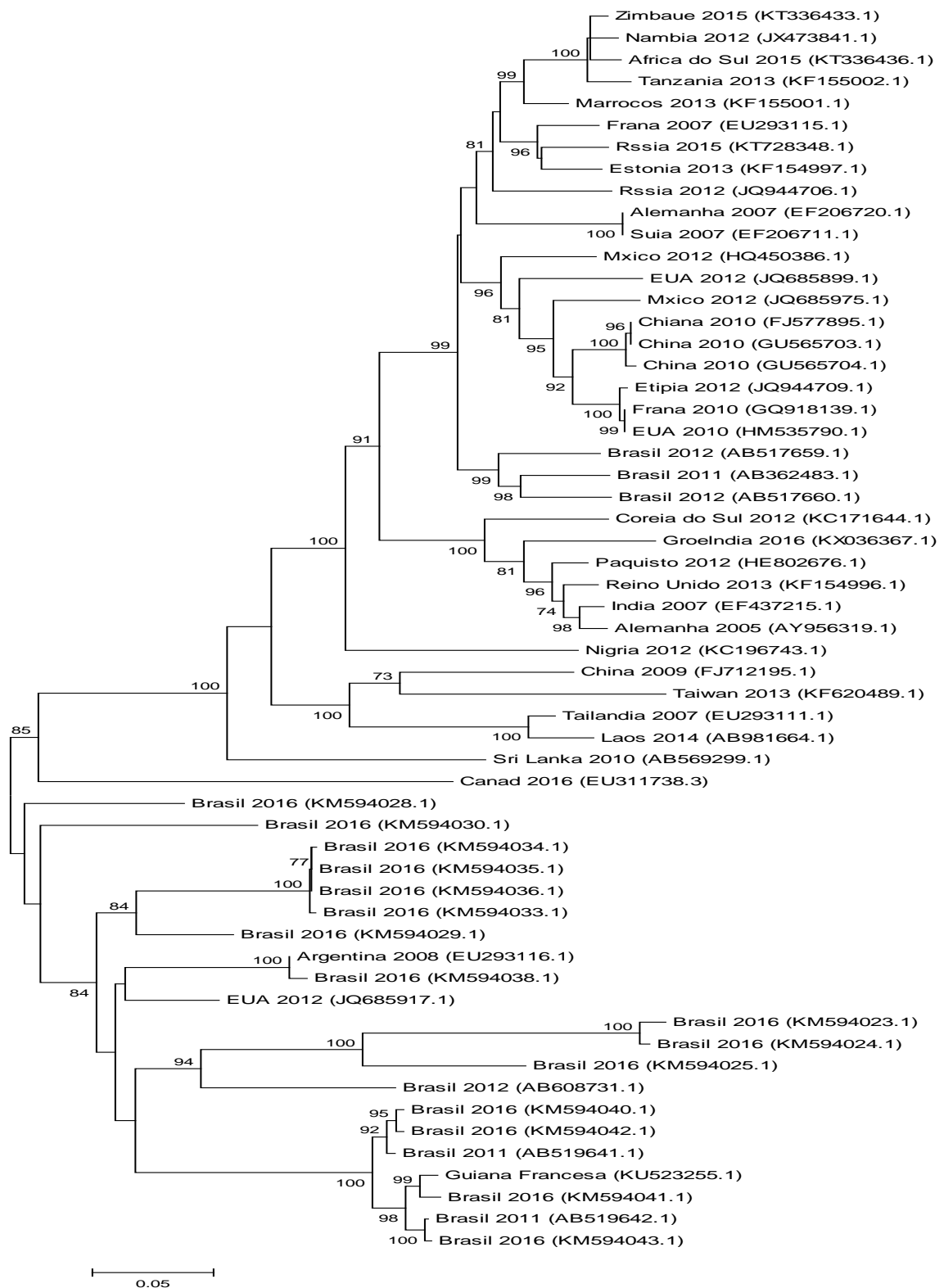


FIGURA 6: Árvore filogenética baseada no gene da fosfoproteína (P) do vírus da raiva (RABV) das sequências disponíveis no *GenBank* (NCBI), reconstruída utilizando o programa MEGA 6.06.

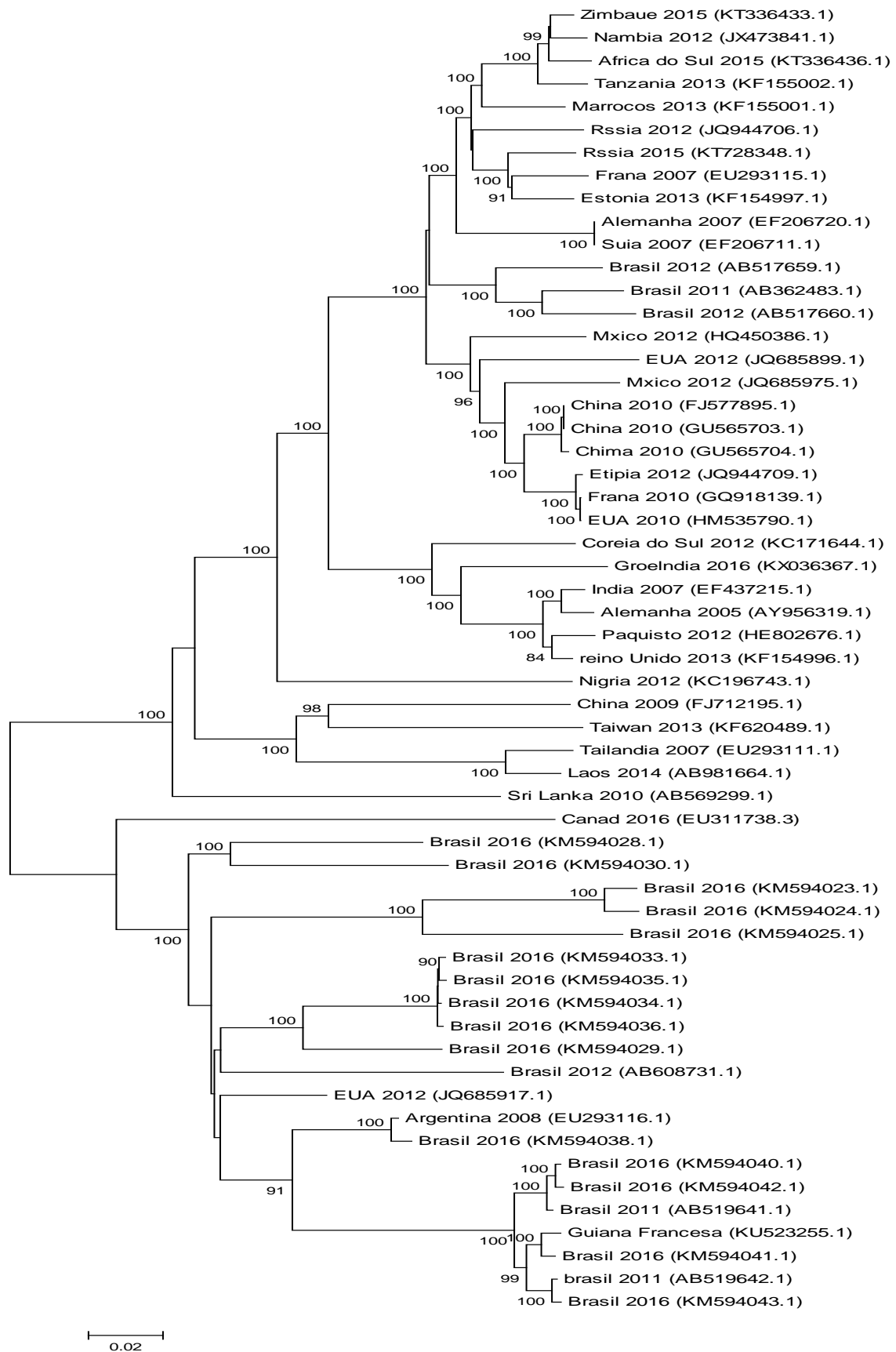


FIGURA 7: Árvore filogenética baseada no gene da polimerase (L) do vírus da raiva (RABV) das sequências disponíveis no *GenBank* (NCBI), reconstruída utilizando o MEGA 6.06.